

**HIGHER CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE AND ITS PRODUCTION**

**Patent number:** JP5068580  
**Publication date:** 1993-03-23  
**Inventor:** SHIMAI YOSHIYUKI; KIMOTO KATSUICHI; KOGA TSUTOMU; SEINO HARUYOSHI  
**Applicant:** PIAS ARISE KK  
**Classification:**  
**- international:** B01D61/14; C12P19/26  
**- european:**  
**Application number:** JP19910310275 19910913  
**Priority number(s):** JP19910310275 19910913

**Report a data error here**

**Abstract of JP5068580**

**PURPOSE:**To obtain the subject oligosaccharide useful as medicines, cosmetics, etc., in high yield by carrying out chitosan hydrolyzing reaction with a chitosan hydrolase in an ultrafilter, then removing the produced chitosan oligosaccharide to the outside of the ultrafilter, supplying a chitosan solution and repeating the reaction. **CONSTITUTION:**Chitosan hydrolyzing reaction with an enzyme having the chitosan hydrolyzing activity is carried out in an ultrafilter having a membrane permeability regulated so that  $\geq 40\text{wt.}\%$  higher chitosan oligosaccharide which is a penta- to octadecasaccharide can be contained in a mixture of the chitosan oligosaccharide permeating the membrane to produce a chitosan oligosaccharide mixture containing the chitosan oligosaccharide. The resultant chitosan oligosaccharide mixture is then removed to the outside of the ultrafilter. A chitosan solution corresponding to the amount of the removed mixture is fed into the ultrafilter. The chitosan hydrolyzing reaction, removal of the chitosan oligosaccharide mixture and feed of the chitosan solution are then continuously carried out to afford the objective higher chitosan oligosaccharide.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-68580

(43) 公開日 平成5年(1993)3月23日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		
B 0 1 D 61/14	5 0 0	8014-4D		

審査請求 未請求 請求項の数11(全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平3-310275

(22) 出願日 平成3年(1991)9月13日

(71) 出願人 000112266

ピラス株式会社

大阪府大阪市北区豊崎3丁目21番3号

(72) 発明者 島居 義侑

高槻市淀の原町50-1

(72) 発明者 木元 勝一

大津市大江3丁目20-35

(72) 発明者 古賀 勉

神戸市須磨区若草町1丁目2-5 グラン  
ドパレス上須磨304号

(72) 発明者 情野 治良

西宮市千歳町3-27 ケネス夙川101号

(74) 代理人 弁理士 藤本 昇

(54) 【発明の名称】 高級キトサンオリゴ糖及び高級キチンオリゴ糖の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 キトサン又はキチンの部分分解質であるオリゴ糖のうち、比較的高重合度のオリゴ糖を製造する方法を提供することを目的とする。

【構成】 本発明の高級キトサンオリゴ糖の製造方法の特徴は、キトサン分解活性を有する酵素によるキトサン分解反応を、膜透過率が最大に調整された限外濾過器内で行って高級キトサンオリゴ糖を含むキトサンオリゴ糖混合物を生成した後、そのキトサンオリゴ糖混合物を限外濾過器外へ除去し、次にその除去分に相当するキトサン溶液を前記限外濾過器内に供給し、その後、前記キトサン分解反応、前記キトサンオリゴ糖混合物の除去、及び前記キトサン溶液の供給を連続的に繰り返して高級キトサンオリゴ糖を製造することにある。また、高級キチンオリゴ糖の製造方法の特徴は、上記高級キトサンオリゴ糖の製造方法で生成されるキトサンオリゴ糖をN-アセチル化して7~18糖の水難溶性の高級キチンオリゴ糖を製造することにある。

BEST AVAILABLE COPY

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】キトサン分解活性を有する酵素によるキトサン分解反応を、膜透過率が最大に調整された限外濾過器内で行って高級キトサンオリゴ糖を含むキトサンオリゴ糖混合物を生成した後、そのキトサンオリゴ糖混合物を限外濾過器外へ除去し、次にその除去分に相当するキトサン溶液を前記限外濾過器内に供給し、その後、前記キトサン分解反応、前記キトサンオリゴ糖混合物の除去、及び前記キトサン溶液の供給を連続的に繰り返して高級キトサンオリゴ糖を製造することを特徴とする高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項2】膜を透過するキトサンオリゴ糖の混合物中に5～18糖の高級キトサンオリゴ糖を40重量%以上含有するように膜透過率が調整された限外濾過器内で、キトサン分解活性を有する酵素によるキトサン分解反応を行って高級キトサンオリゴ糖を含むキトサンオリゴ糖混合物を生成した後、そのキトサンオリゴ糖混合物を限外濾過器外へ除去し、次にその除去分に相当するキトサン溶液を前記限外濾過器内に供給し、その後、前記キトサン分解反応、前記キトサンオリゴ糖混合物の除去、及び前記キトサン溶液の供給を連続的に繰り返して高級キトサンオリゴ糖を製造することを特徴とする高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項3】膜を透過するキトサンオリゴ糖の混合物の生成還元糖が100～600 (mg・D-グルコサミン/g)となるように膜透過率が調整された限外濾過器内で、キトサン分解活性を有する酵素によるキトサン分解反応を行って高級キトサンオリゴ糖を含むキトサンオリゴ糖混合物を生成した後、そのキトサンオリゴ糖混合物を限外濾過器外へ除去し、次にその除去分のキトサン溶液を前記限外濾過器内に供給し、その後、前記キトサン分解反応、前記キトサンオリゴ糖混合物の除去、及び前記キトサン溶液の供給を連続的に繰り返して高級キトサンオリゴ糖を製造することを特徴とする高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項4】前記生成されるキトサンオリゴ糖混合物を乾燥して得られる固形物に重量5～25倍量のメタノールを加え不溶物として5～18糖の高級キトサンオリゴ糖を70重量%以上含むキトサンオリゴ糖混合物を製造する請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項5】前記キトサン分解活性を有する酵素反応の基質として用いられるキトサンの脱アセチル化度が50～100%である請求項1乃至請求項4のいずれかに記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項6】前記キトサン分解活性を有する酵素反応の基質として用いられるキトサンが、分子量5000～200000の低分子キトサンである請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

2

【請求項7】前記キトサン分解活性を有する酵素がキトサナーゼである請求項1乃至請求項6のいずれかに記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項8】前記キトサナーゼが、バチルス属に属する微生物由来の酵素であって、至適pH4.8～6.8, 安定pH3.3～7.4, 可溶化された脱アセチル化度50～100%のキトサンに対する分解能が良好なキトサナーゼである請求項7記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項9】前記バチルス属に属する微生物がバチルス s p. P I-7 S (微工研菌寄第9843号)である請求項8記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項10】請求項1記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法で生成されるキトサンオリゴ糖をN-アセチル化して7～18糖の高級キチンオリゴ糖を製造することを特徴とする高級キチンオリゴ糖の製造方法。

【請求項11】請求項1記載の高級キトサンオリゴ糖の製造方法で生成されるキトサンオリゴ糖をN-アセチル化した後、水に溶解するとともにアセトンで処理して4～7糖の高級キチンオリゴ糖を製造することを特徴とする高級キチンオリゴ糖の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は高級キトサンオリゴ糖及び高級キチンオリゴ糖の製造方法、さらに詳しくは、キトサン又はキチンの部分分解物であるオリゴ糖のうち、比較的高重合度のオリゴ糖を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】一般に、キトサンの部分分解物であるキトサンオリゴ糖は、食品添加物、化粧品、医薬品等の用途への開発が望まれており、特に、5糖以上の高級キトサンオリゴ糖は、近年において抗菌性、抗腫瘍性、免疫賦活性、植物エリシター活性等の種々の生理活性を有することが見出されており、その付加価値や需要が高まっている。

【0003】また、このような高級キトサンオリゴ糖のN-アセチル化物である高級キチンオリゴ糖は、上記高級キトサンオリゴ糖と同様な生理活性を有する他、レクチン阻害性にも優れ、またキチナーゼやリゾチームの基質として非常に有用であるという特質を有する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、このような5糖以上の高級キトサンオリゴ糖や高級キチンオリゴ糖を効率的に生産する方法は未だ確立されていない。特に7糖以上の高級キトサンオリゴ糖、高級キチンオリゴ糖は、調製が困難で現在市販されていないのが現状である。

【0005】尚、キトサナーゼ酵素的分解によるキトサンオリゴ糖の生産は、キトサンが希酸に容易に溶解するため有効と認められ、現に2, 3の報告があるが[M.

BEST AVAILABLE COPY

Izume and A. Ohtakara, Agric. Biol. Chem, 51, 1189 (1987) / 三好洋ら, 第5回キチン・キトサンシンポジウム要旨集p90 (1991)〕、5糖以上のキトサンオリゴ糖の収率は低い。

【0006】また、リゾチームの糖転移反応を利用して2糖から6糖、7糖等の高級キチンオリゴ糖を生産する報告があるが〔碓氷泰市ら, 第3回キチン・キトサンシンポジウム要旨集p30 (1988)〕、2糖のキチンオリゴ糖は現在のところ価格が高いのでコストの面で問題がある。

【0007】さらに、キトサナーゼによるキトサン分解反応を、酵素反応のみを用いるいわゆるパッチ法で行うと、2〜5糖を主に生産し、5糖以上の高級キトサンオリゴ糖の生産性は低い。

【0008】本発明は、上述のような問題点をすべて解決するためになされたもので、高級キトサンオリゴ糖、高級キチンオリゴ糖を大量に連続生産可能ならしめることを課題とする。

【0009】

〔課題を解決するための手段〕本発明は、このような課題を解決せんとして高級キトサンオリゴ糖及び高級キチンオリゴ糖の製造方法としてなされたもので、高級キトサンオリゴ糖の製造方法としての特徴は、キトサン分解活性を有する酵素によるキトサン分解反応を、膜透過率を最大に調整した限外濾過器内で行って高級キトサンオリゴ糖を含むキトサンオリゴ糖混合物を生成した後、そのキトサンオリゴ糖混合物を限外濾過器外へ除去し、次にその除去分のキトサン溶液を前記限外濾過器内に供給し、その後、前記キトサン分解反応、前記キトサンオリゴ糖の除去、及び前記キトサン溶液の供給を連続的に繰り返して高級キトサンオリゴ糖を製造することにある。

【0010】また、高級キチンオリゴ糖の製造方法としての特徴は、上記のような高級キトサンオリゴ糖の製造方法で生成されるキトサンオリゴ糖をN-アセチル化して8〜18糖の水難溶性の高級キチンオリゴ糖を製造することにある。

【0011】ここで、酵素反応の基質として用いるキトサンは、可溶状態であるキトサン溶液であればよいが、特に分子量5000〜200000の低分子キトサンを用いることによって粘度の低い高濃度のキトサン溶液の調製が可能となり、高級キトサンオリゴ糖の収率が著しく高まるという利点がある。

【0012】また、用いる緩衝液は酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液が好ましいが、これも特に限定されるものではない。

【0013】さらに、キトサン溶液のpHは酵素の至適pH付近であればよく、特に限定されない。

【0014】また、キトサンの濃度も限定されないが、高濃度3%以上が好ましい。

【0015】さらに限外濾過器の種類も限定されるものではなく、また限外濾過膜の材質も問わない。要は、酵素を透過させず、キトサンオリゴ糖を透過させる膜を用いればよいのである。

【0016】さらに、酵素はキトサナーゼが好ましいが、脱アセチル化度50〜100%のキトサン分解性が良いものであればよく、たとえばリゾチーム、キチナーゼ、セルラーゼを用いることも可能であり、その種類は特に限定されない。

【0017】尚、本発明の製造方法によって得られるキトサンオリゴ糖の組成比の経時的な変化はほとんど見られなかった。また、限外濾過膜の透過速度は徐々に減少するが、これは酵素活性の低下よりもむしろ膜のよごれによるものであり、膜を洗浄することによって解消できる。

【0018】

【実施例】以下、本発明の実施例について説明する。

#### 実施例1

5%低分子キトサン〔脱アセチル化度約90%、分子量1.6×10<sup>4</sup>〜1.7×10<sup>5</sup> / 共和油脂(株)製〕溶液400ml (pH5.2) にバチルス sp. PI-7S (微工研菌第9843号) 由来の粗キトサナーゼ液68ml (6U/ml) を加え、37℃での酵素反応を限外濾過器内で行った。粗キトサナーゼ溶液としては、培養濾液を限外濾過器で濃縮したものを用いた。

【0019】次に、生成オリゴ糖を素早く反応系外へ除去し、その減少分に相当する5%低分子キトサン溶液を加えた。

【0020】限外濾過器は日本ミリポアリミテッド株式会社のMinitan Ultrafiltration Systemを用い、限外濾過膜は、分画分子量10000、濾過面積は600cm<sup>2</sup>、圧力は20psiに調整した。

【0021】操作時間は透過液が出始めてから80時間行なった。

【0022】またキトサンオリゴ糖の分析はHPLCで行った。各時間毎の透過膜液の乾燥物(キトサン分解物)に含まれるキトサンオリゴ糖の組成比をHPLCで求めたところ、ほぼ一定であり経時の変化は見られなかった。また、透過膜液のpHをアルカリ性にしても沈澱はほとんど生じなかった。

【0023】膜透過速度は徐々に減少し、その分、キトサンオリゴ糖の生産量も徐々に減少する傾向が認められた。ちなみに、18時間目から80時間目の減少率は26%であった。

【0024】さらにHPLCはカラムとしてTSK Gel amide-80 (4.6×25cm)、溶出液としてアセトニトリル/50mMリン酸(4:6)を用いることによって行なった。流速は0.7ml/minに調整した。

5

【0025】上記実施例1によって得られた1時間目から10時間目の全膜透過液2100mlをエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥することによって固形のキトサンオリゴ糖混合物108gを得た。Schales法で求めた生成還元糖は330 (mg・D-グルコサミン/g)であった。

【0026】HPLCで分析したところ2糖:2.0%, 3糖:13.3%, 4糖:13.1%, 5糖:18.7%, 6糖:18.0%, 7糖:14.1%, 8糖:9.7%, 9糖:5.5%, 10糖:4.1%, 11糖:1.5%が含まれており、5糖以上の高級キトサンオリゴ糖の含有量は71.6%であった。その分析結果は図1に示す。図1において、チャートの各ピーク付近に付された2~11の数字は、それぞれ2糖, ... 11糖のピークを示す。

【0027】尚、上記実施例1で用いたキトサナーゼの生産能を有するバチルス sp. PI-7S (微工研菌寄第9843号)は、本発明者等が採取した菌株で、その菌学的性質は次のとおりである。

(A) 形態学的性質

(a) 菌の形態

桿 菌

(b) 芽胞

楕円形、膨出

(c) 運動性

あり

(d) グラム染色性

不定

(B) 次の各培地における生育状態

(a) 肉汁寒天培地

37℃で24~96時間培養を行ったところ、全周縁が突円状のコロニーが形成され、時間の経過とともに盛り上がりてきた。色は、24時間培養時においてはほぼ白濁色であるが、48時間培養時以降から薄黄色又は黄色を帯びてきた。生育状態は陽性と認められた。

(b) 肉汁液体攪拌培地

好気性であり、37℃で24時間培養を行ったところ、白濁色となった。生育状態は陽性と認められた。

(C) 嫌気下での発育

発育せず

(D) 生理学的性質

(a) カタラーゼの生成 +

(b) VP反応 +W

(c) VPプロスでのpH 4.8

(d) グルコースからのガスの産性 -

(e) 酸の産性

①グルコース +

②アラビノース -

③キシロース -

④マンニット +

6

(f) ゼラチンの液化 +

(g) デンプンの分解 +

(h) チロシンの分解 -

(i) クエン酸の利用性 -

(j) 卵黄反応 -

(k) 硝酸塩の還元 -

(l) インドール産生 -

(m) pH5.7での生育 +

(n) 5%NaCl存在下の生育 -

(o) 7%NaCl存在下の生育 -

(p) 50℃での生育 -

尚、上記において+は陽性、-は陰性、+Wは弱陽性をそれぞれ意味する。この菌株については、昭和63年1月28日に工業技術院微生物工業技術研究所にすでに寄託している。

【0028】実施例2

上記実施例1で得られたキトサンオリゴ糖混合物をメタノール6500mlで溶解し、その操作で溶解しないメタノール不溶物35gを得た。HPLCで分析したところ、3糖:3.3%, 4糖:4.3%, 5糖:9.0%, 6糖:12.6%, 7糖:14.3%, 8糖:14.9%, 9糖:14.0%, 10糖:13.1%, 11糖:8.3%, 12糖:5.9%が含まれており、5糖以上の高級キトサンオリゴ糖の含有量は92.3%であった。その分析結果は図2に示す。図2において、チャートの各ピーク付近に付された3~12の数字は、それぞれ3糖, ... 12糖のピークを示す。このように、メタノール不溶物とすることによって、キトサンオリゴ糖混合物中の高級キトサンオリゴ糖の含有量が向上することが認められた。

【0029】実施例3

酵素としてバチルス sp. PI-7S (微工研菌寄第9843号)由来の粗キトサナーゼ68ml (9U/ml)を用いて実施例1と同じ方法でキトサンオリゴ糖生産を行った。1時間目から10時間目の膜透過液をエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥することによってキトサンオリゴ糖混合物119gを得た。Schales法で求めた生成還元糖は380 (mg・D-グルコサミン/g)であった。

【0030】HPLCで分析したところ、2糖:5.0%, 3糖:15.7%, 4糖:19.7%, 5糖:22.0%, 6糖:18.0%, 7糖:10.1%, 8糖:4.8%, 9糖:2.9%, 10糖:1.8%が含まれており、5糖以上の高級キトサンオリゴ糖の含有量は59.6%であった。

【0031】実施例4

上記実施例1で得られたキトサンオリゴ糖混合物12gをメタノール120ml, 蒸留水75mlで溶解し、氷冷下で無水酢酸43mlを加え8時間放置した。エタノール-アセトン混合液(1:1)1000mlを添加

し、沈澱を採取するとともに酢酸を除去し凍結乾燥することによってキチンオリゴ糖10.2gを得た。尚、IR分析によって生成物がキチンオリゴ糖であることを確認した。その分析結果は図4に示す。

【0032】次に、蒸留水300mlを加え、不溶物として2.2gを得た。得られた上清液にアセトン900mlを加えることにより、沈澱として4.1gを得た。

【0033】HPLCにて分析したところ、4糖：9.7%，5糖：60.3%，6糖：30.0%が含まれていた。その分析結果を図3に示す。図3において、チャート

の各ピーク付近に付された4～6の数字は、それぞれ4糖，5糖，6糖のピークである。

【0034】尚、HPLCとしては、TSK gel amide-80 (4.6×25cm)，溶出液としてアセトニトリル/水 (6：4) を用いることによって行った。流速は0.7ml/minに調整した。

#### 【0035】比較例

5%低分子キトサン溶液2100ml (pH5.2) に粗キトサナーゼ68ml (6U/ml) を加え、37°Cで10時間攪拌しながらバッチ法で酵素反応を行った。反応後、酵素反応液を分画分子量10000の限外濾過膜によって酵素及び未分解のキトサンを除いた後、濃縮後、凍結乾燥を行うことによってキトサンオリゴ糖69gを得た。

【0036】上記オリゴ糖をHPLCで分析したところ、2糖：22.9%，3糖：35.1%，4糖：26.5%，5糖：15.5%であり、6糖以上は含まれ

ていなかった。

#### 【0037】

【発明の効果】叙上のように、本発明は膜透過率を最大に調整した限外濾過器を用いてキトサンと高級キトサンオリゴ糖とを濾別し、高級キトサンオリゴ糖を含むキトサンオリゴ糖混合物を反応系外に除去した後、その除去分のキトサン溶液を前記限外濾過器内に供給し、この作業を連続的に繰り返して高級キトサンオリゴ糖を製造する方法であるため、高級キトサンオリゴ糖の2次的分解が阻害されて限外濾過器外で得られる高級キトサンオリゴ糖の収率が高まり、高級キトサンオリゴ糖の製造を大量に行うことができるという効果がある。

【0038】特に、本発明では、従来のバッチ法等では得られ難かった5糖以上の高級キトサンオリゴ糖を高収率で大量に製造しうるため、優れた種々の生理活性を有する5糖以上の高級キトサンオリゴ糖を実用に供することができるという実益がある。

【0039】さらに、上記のような方法で得られたキトサンオリゴ糖をN-アセチル化することによって高級キチンオリゴ糖を得ることができ、キトサンオリゴ糖に近似した生理活性を有するキチンオリゴ糖をも大量に製造できるという効果がある。

#### 【図面の簡単な説明】

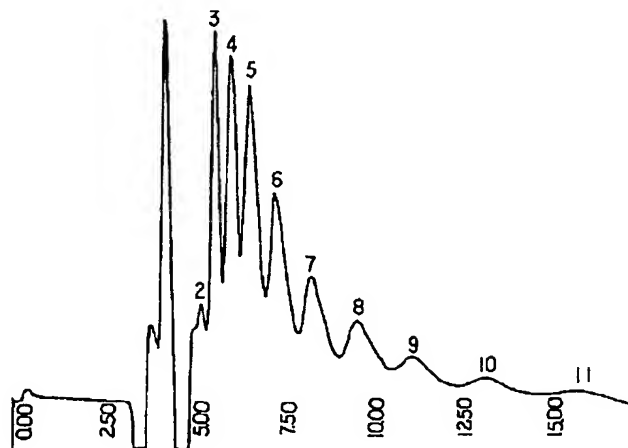
【図1】実施例1のHPLCの分析チャート。

【図2】実施例2のHPLCの分析チャート。

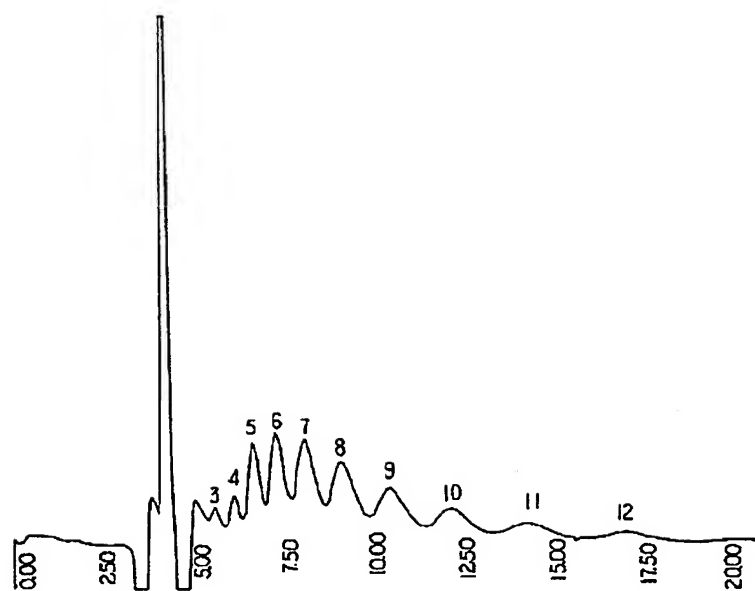
【図3】実施例4のHPLCの分析チャート。

【図4】実施例4のIRの分析チャート。

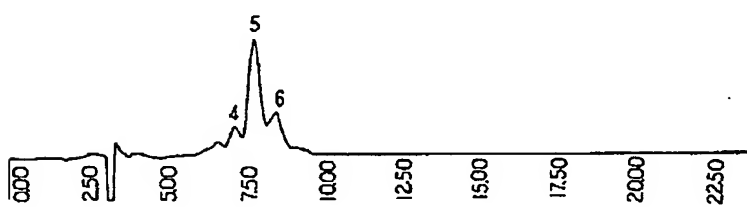
【図1】



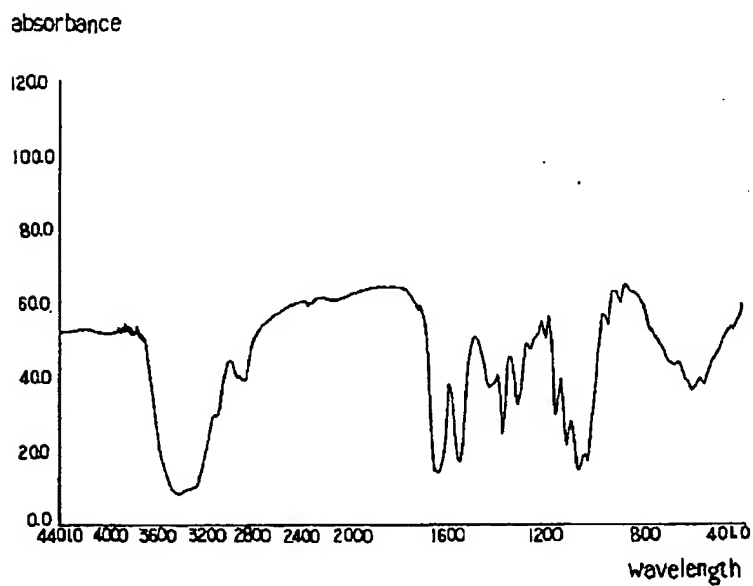
【図2】



【図3】



【図4】



BEST AVAILABLE COPY

1. The first part of the document is a list of the names of the persons who have been named in the document. The names are listed in alphabetical order.